

**KARAKTERISTIK GENETIK PADA RUSA TIMOR  
(*Cervus timorensis*) DAN RUSA BAWEAN(*Axis kuhlii*)  
BERDASARKAN SEKUEN GEN COX-2  
(*Cytochrome c oxidase subunit 2*)  
DENGAN METODE *POLYMERASE  
CHAIN REACTION* (PCR)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**ANDI CITRA SEPTANINGSIH**

**145130101111011**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

repository.ub.ac.id

**KARAKTERISTIK GENETIK PADA RUSA TIMOR  
(*Cervus timorensis*) DAN RUSA BAWEAN(*Axis kuhlii*)  
BERDASARKAN SEKUEN GEN COX-2  
(*Cytochrome c oxidase subunit 2*)  
DENGAN METODE *POLYMERASE  
CHAIN REACTION* (PCR)**

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

**ANDI CITRA SEPTANINGSIH**

**145130101111011**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**201**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI****KARAKTERISTIK GENETIK PADA RUSA TIMOR (*Cervus timorensis*) DAN  
RUSA BAWEAN(*Axis kuhlii*) BERDASARKAN SEKUEN GEN COX-2  
(*Cytochrome c oxidase subunit 2*) DENGAN METODE *POLYMERASE  
CHAIN REACTION* (PCR)****Oleh:****ANDI CITRA SEPTANINGSIH****145130101111011**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 31 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am,drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**Wibi Riawan, S.Si., M.Sc**  
NIP. 19770131 200501 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am,drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Andi Citra Septaningsih  
NIM : 145130101111011  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

**Karakteristik Genetik Pada Rusa Timor (*Cervus Timorensis*) Dan Rusa Bawean (*Axis Kuhlii*) Berdasarkan Sekuen Gen Cox-2 (*Cytochrome C Oxidase Subunit 2*) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (Pcr)***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 31 Juli 2018  
Yang menyatakan,

**(Andi Citra Septaningsih)**  
**NIM. 145130101111011**

**Karakteristik Genetik Pada Rusa Timor (*Cervus Timorensis*) Dan Rusa Bawean(*Axis Kuhlii*) Berdasarkan Sekuen Gen Cox-2 (*Cytochrome C Oxidase Subunit 2*) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

**ABSTRAK**

Rusa Timor dan Rusa Bawean merupakan salah satu hewan endemik Indonesia, yang memiliki karakteristik genetik yang beragam. Pengkajian keragaman genetik melalui penandaan molekuler menggunakan DNA mitokondria (mtDNA) membantu dalam mengetahui perbedaan dengan lebih akurat dalam membedakan intra dan interspesies sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan mutu genetik. Di dalam genom mitokondria terdapat fragmen-fragmen penyandi protein dan yang bukan penyandi protein. Fragmen bukan penyandi protein yang sering digunakan dalam mengkaji hubungan kekerabatan di antara spesies adalah daerah Cox-2 (*Cytochrome c oxydase subunit 2*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik genetik antara Rusa Timor dan Rusa Bawean berdasarkan sekuen gen Cox-2 dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Rusa Timor (*Cervus timorensis*) dan dibandingkan dengan database NCBI serta jarak genetiknya dengan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*). DNA didapatkan dari empat sampel *wholeblood* Rusa Timor jantan dan betina sejumlah 2 sampel dan Rusa Bawean jantan betina sejumlah 2 sampel di Taman Safari 2 Prigen Pasuruan yang kemudian diisolasi menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer. *Forward* (COX-2) 5,, GCACAATAGACGCTCAAGAG"3 dan *Reverse* (COX-2) 5,,GAAGCT GTGATTTGATCCGC"3. Sekuens hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen dan kekerabatan menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST. Susunan nukleotida sampel Rusa timor dan Rusa bawean berdasarkan sekuen gen Cox-2 memiliki urutan sebesar 301bp. Sampel B04001RT dan sampel B03003RT yaitu Rusa timor (12D dan 13D) adalah genus yang berbeda yang berbeda dengan sampel B05006 RB dan sampel B0500RB yaitu Rusa bawean (14D dan 15D) dikarenakan berada pada *clade* yang berbeda.

Kata kunci : Rusa Timor, Rusa Bawean, mtDNA, Cox-2, PCR

**Genetic Characteristics of Timor deer (*Cervus Timorensis*) and Bawean deer (*Axis Kuhlii*) Based on Cox-2 (Cytochrome C Oxidase Subunit 2) Sequences With Polymerase Chain Reaction (PCR) Method**

**ABSTRACT**

The Timor deer and Deer Bawean are one of Indonesia's endemic animals, which have various genetic characteristics. Assessing genetic diversity through molecular marking using mitochondrial DNA (mtDNA) helps in knowing the differences more accurately in differentiating intra and interspecies that can be used to improve genetic quality. In the mitochondrial genome there are protein-coding fragments and non-coding proteins. The non-coding fragment of a protein often used in assessing kinship relationships among species is the Cox-2 (Cytochrome c oxydase subunit 2) area. The aim of this study was to investigate the genetic characteristics of Timor deer and Deer Bawean based on Cox-2 gene sequence by Polymerase Chain Reaction (PCR) method on Timor deer (*Cervus timorensis*) and compared with NCBI database and genetic distance with Bawean Deer (*Axis kuhlii*). DNA was obtained from four male and female Timor male whole blood samples of 2 samples and 2 male Bawean Deer Deer at 2 Taman Safari 2 Prigen Pasuruan which was isolated using QIAamp® DNA Mini Kit. Primer used in PCR method is primer. Forward (COX-2) 5 "GCACAATAGACGCTCAAGAG" 3 and Reverse (COX-2) 5 "GAAGCT GTGATTTGATCCGC" 3. The sequence of PCR results is done by the Sanger method. Analysis of gene and kinship sequences using Bioedit and NCBI BLAST programs. The nucleotide sequence of the Deer deer and deer samples based on the Cox-2 gene sequence has a sequence of 301bp. Samples B04001RT and B03003RT samples are Deer timor (12D and 13D) are different genus which differs from B05006 RB sample and B0500RB sample ie Bawean Deer (14D and 15D) due to being on different clade.

Keywords: Timor Deer, Bawean Deer, mtDNA, Cox-2, PCR



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Karakteristik Genetik Pada Rusa Timor (*Cervus Timorensis*) Dan Rusa Bawean(*Axis Kuhlü*) Berdasarkan Sekuen Gen Cox-2 (*Cytochrome C Oxidase Subunit 2*) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (Pcr)*”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya proposal skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dosen Pembimbing dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan bimbingan, kesabaran, dan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
2. Wibi Riawan, S.Si., M.Sc selaku Dosen Pembimbing atas bimbingan, kesabaran, dukungan, fasilitas dan waktu.
3. drh. Yudit Oktanela, M.Si selaku Dosen Penguji dalam menguji dan memberikan saran.
4. drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si selaku Dosen Penguji dalam menguji dan memberikan saran.
5. drh. Aulia Firmawati, M.Vet. selaku Dosen Penguji dalam menguji dan memberikan saran.
6. drh. Nanang Tejolaksono dari pihak Taman Safari Indonesia II Prigen yang telah memberikan ide penelitian skripsi dan bantuan.

7. Orangtua tercinta Andi Ramlan dan Sunarsih, serta adik Andi Dewi Kumalasari yang tersayang dalam memberikan segala pengorbanan yang besar, materi, doa, motivasi, dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis
8. Teman-teman seperjuangan kelompok penelitian Nur Jauharah, Seruni Umami, Dinul Hamdi, Rifqi Rahman, dan Ahmad Ikhwan yang memberikan dorongan yang begitu besar untuk semangat, motivasi, dukungan, dan kerjasama dalam penelitian ini.
9. Mas Muhammad Abdillah yang memberikan ide parameter, bantuan, semangat, dan motivasi dalam proses penelitian skripsi ini.
10. Keluarga besar Improve KELAWAR yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan tentang satwa liar dan anggota kelas AMAZE yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 31 Juli 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xiv
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Rusa Timor ( <i>Cervus timorensis</i> ).....	6
2.2 Rusa Bawean ( <i>Axis khulii</i> ).....	8
2.3 DNA Mitokondria (mtDNA).....	10
2.4 COX-2 (Cythochrome c oxydase subunit 2).....	12
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
2.6 Amplifikasi PCR.....	15
2.6.1 Denaturasi.....	16
2.6.2 Annealing.....	17
2.6.3 Extension.....	18
2.7 Desain Primer.....	18
2.8 Sekuen DNA.....	20
 <b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep.....	22
3.2 Bagan Kerangka Konseptual.....	23
3.3 Hipotesa Penelitian.....	24
 <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
4.2 Sampel Penelitian.....	25
4.3 Alat dan Bahan.....	26
4.4 Tahapan Penelitian.....	26
4.5 Rancangan Penelitian.....	27

4.6 Prosedur Kerja.....	28
4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Rusa Timor dan Rusa Bawean...	28
4.6.2 Isolasi DNA.....	28
4.6.3 Uji Kuantitas DNA.....	29
4.6.4 Uji Kualitas DNA.....	30
4.6.5 Desain Primer.....	30
4.6.6 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	31
4.6.7 Uji Kualitas dan Kuantitas Produk PCR.....	31
4.6.8 Purifikasi Produk PCR.....	31
4.6.9 Sekuensing DNA.....	32
4.6.10 Analisa Data.....	32
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Isolasi DNA Rusa Timor dan Rusa Bawean.....	33
5.2 Amplifikasi Gen Cox-2 dengan Metode PCR.....	36
5.3 Sekuen Gen Cox-2.....	39
5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Cox-2.....	41
5.5 Karakteristik Genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean Berdasarkan Pohon Filogenetik.....	44
<b>BAB 6 PENUTUP</b>	
6.1 Kesimpulan.....	48
6.2 Saran.....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	49
<b>LAMPIRAN.....</b>	53

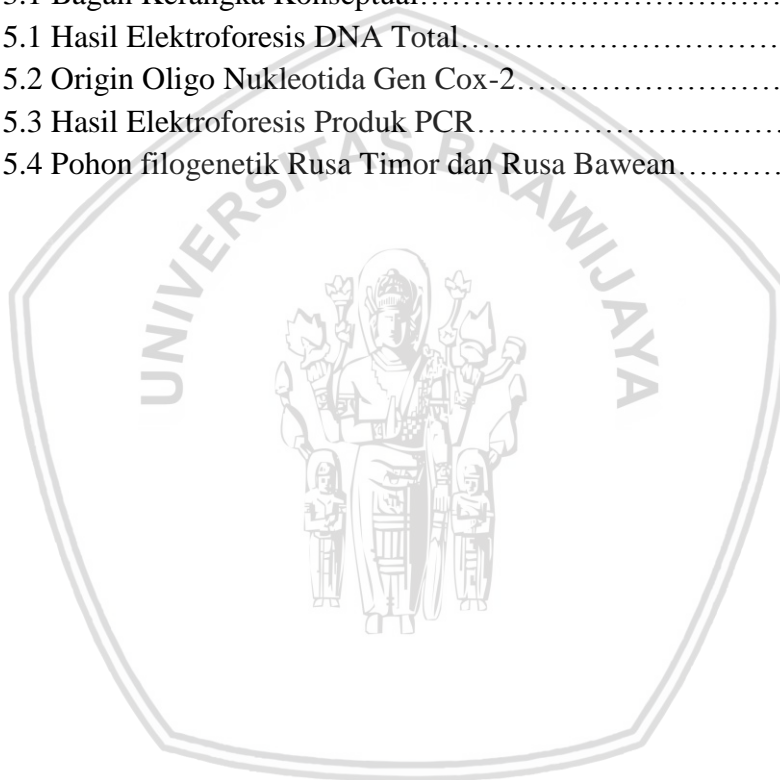
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Rusa Timor dan Rusa Bawean.....	25
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rusa Timor dan Rusa Bawean	33
Tabel 5.2 Urutan Oligo Nukleotida Primer gen Cox-2 Rusa Timor .....	37
Tabel 5.3 Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen Cox-2.....	37
Tabel 5.4. Query coverage dan ident sampel.....	40
Tabel 5.5 Perubahan basa terhadap Referensi.....	41
Tabel 5.6 Jenis Mutasi pada Sampel.....	42



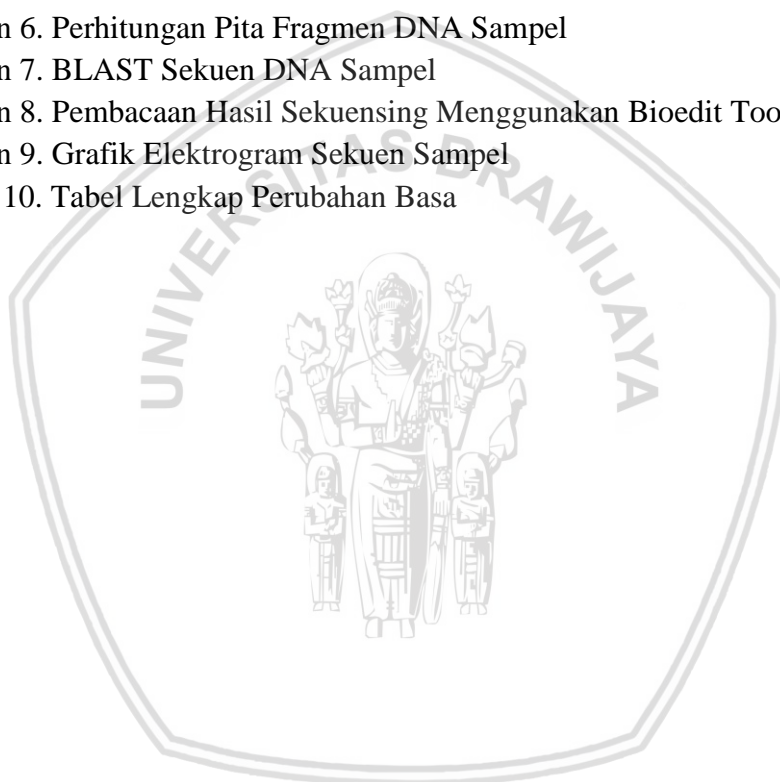
**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Gambar Rusa Timor.....	7
Gambar 2.2 Gambar Rusa Bawean.....	9
Gambar 2.3 DNA Mitokondria.....	11
Gambar 2.4 Skema satu siklus PCR.....	15
Gambar 2.5 Skema sekuensing DNA metode Sanger.....	21
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	23
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total.....	35
Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen Cox-2.....	37
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR.....	38
Gambar 5.4 Pohon filogenetik Rusa Timor dan Rusa Bawean.....	45



**DAFTAR LAMPIRAN**

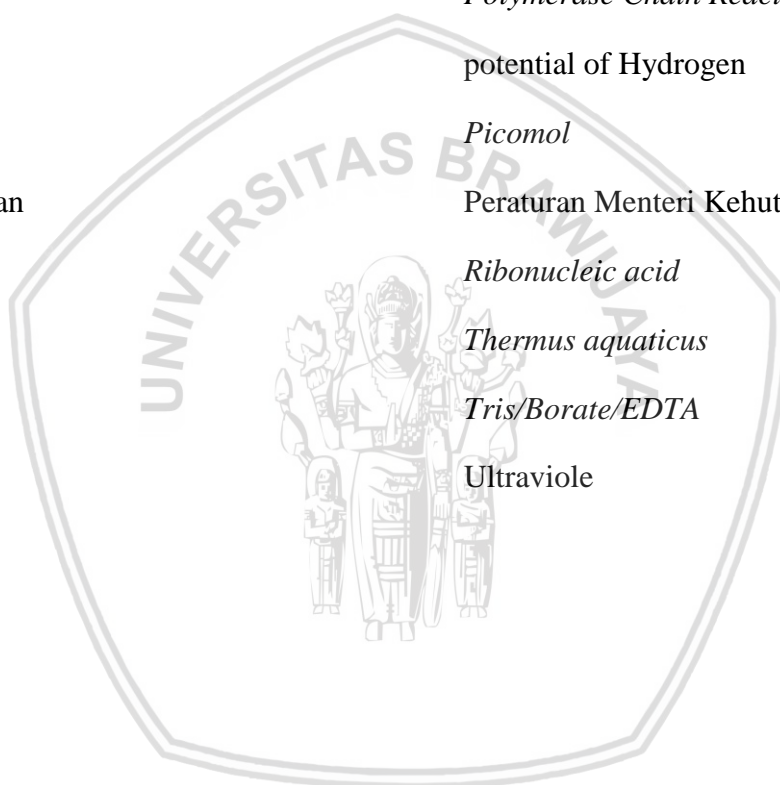
<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Protokol Pengambilan Sampel Darah Rusa Timor dan Rusa Bawen	54
Lampiran 2. Protokol Isolasi DNA	55
Lampiran 3. Uji Kuantitas DNA	56
Lampiran 4. Uji Kualitas DNA	58
Lampiran 5. Desain Primer	59
Lampiran 6. Perhitungan Pita Fragmen DNA Sampel	63
Lampiran 7. BLAST Sekuen DNA Sampel	64
Lampiran 8. Pembacaan Hasil Sekuensing Menggunakan Bioedit Tools	67
Lampiran 9. Grafik Elektrogram Sekuen Sampel	69
Lampiran 10. Tabel Lengkap Perubahan Basa	71



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
AE	<i>Eluted buffer</i>
AIDS	Acquired Immunodeficiency syndrome
AL	<i>Lysis buffer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
EtBr	<i>Etidium bromida</i>
g	Gram
HCl	<i>Hydrochloric acid</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Mg	Magnesium

mL	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	messenger-RNA
mtDNA	DNA Mitokondria
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogram
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potential of Hydrogen
Pmol	<i>Picomol</i>
Permentan	Peraturan Menteri Kehutanan
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
UV	Ultraviole









## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Rusa timor (*Cervus timorensis*) dan Rusa bawean (*Axis kuhlii*) merupakan satwa liar yang dilindungi keberadaannya oleh Undang-undang. Penyebab utama penurunan jumlah populasi rusa adalah karena bencana alam (seperti kebakaran hutan, gempa bumi, dan lain sebagainya) selain, itu disebabkan karena kegiatan manusia itu sendiri, seperti perburuan liar, perusakan habitat karena pembukaan kawasan hutan untuk transmigrasi, dan perladangan liar. Secara morfologi rusa timor dan rusa bawean dibedakan dari ukuran tubuh, berat tubuh, dan warna rambut. Pencirian antara rusa timor dan rusa bawean dapat diamati dari secara genetik dengan mengetahui keragaman genetik antara kedua satwa tersebut.

Rusa timor (*Cervus timorensis*) merupakan salah satu mamalia besar yang populasinya mengalami penurunan sehingga dilindungi oleh Pemerintah Republik Indonesia, sebagaimana termaktub dalam lampiran Peraturan Pemerintah Nomor 7 Tahun 1999 tentang Pengawetan Tumbuhan dan Satwa Liar. Menurut IUCN (2013), *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* mengkategorikan rusa timor sebagai *vulnerable* adalah status konservasi yang diberikan kepada spesies yang sedang menghadapi risiko kepunahan di alam liar pada waktu yang akan datang.

Rusa bawean (*Axis kuhlii*) merupakan satwa endemik asli Pulau Bawean, Jawa Timur. Menurut IUCN (2013), *international Union for Conservation of Nature and Natural Resources* mengkatagorikan rusa bawean sebagai *Critically*

*Endangered* adalah status konservasi yang diberikan kepada spesies yang menghadapi resiko kepunahan diwaktu dekat. Dalam IUCN *Redlist* tercatat 1.742 hewan.

Kesamaan genetik (*genetic similary*) di antara individu dan antar populasi dapat diketahui melalui penelitian keragaman genetik yang secara prinsip mengkaji komposisi genetik dalam individu atau antar populasi. Analisis mtDNA (DNA Mitokondria) dapat digunakan untuk mengetahui variabilitas genetik suatu populasi, karena analisis mtDNA lebih sensitif dibandingkan dengan analisis protein yang sudah banyak dilakukan (Iguchi *et al.* dalam Suwarminiwati, 2008). Analisis tersebut dapat mengetahui jarak genetik dan kesamaan genetik rusa timor dengan rusa bawean dengan menggunakan salah satu gen yang berada di dalam mtDNA yaitu Cox-2 (*Cythochrome c oxidase subunit 2*).

Cox-2 merupakan salah satu bagian dari *cythochrome c oxidase subunit 2* yang terlibat dalam transportasi elektron di mitokondria. Gen dari cythochrome c oxidase subunit 2 dikodekan oleh DNA mitokondria. Variasi urutan pada dari cythochrome c oxidase subunit 2 menyebabkan gen ini banyak digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama. Sekuen gen dari cythochrome c oxidase subunit 2 memiliki keunikan, yaitu adanya bagian yang *conserved* (bagian gen yang dapat dipertahankan kepada keturunannya) ditingkat spesies, sehingga dapat digunakan untuk deteksi spesifik pada spesies (Michel, *et al.*, 1998).

Berdasarkan dari pertimbangan diatas, penelitian ini dilakukan untuk melakukan analisis karakteristik genetik pada rusa timor (*cervus timorensis*) dan rusa bawean (*axis kuhlii*) berdasarkan sekuen gen cox-2 (*cythochrome c oxidase subunit 2*) dengan metode *polymerase chain reaction* (pcr).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

- 1) Bagaimana susunan nukleotida Rusa Timor dan Rusa Bawean berdasarkan sekuen gen Cox-2 ( *Cytochrome oxydase subunit 2*)?
- 2) Bagaimna karakteristik genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean secara genotip berdasarkan analisis pohon filogenetik (*phylogenetic tree*)?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Sampel darah yang digunakan yaitu darah Rusa Timor sejumlah dua sampel (satu ekor jantan dan satu ekor betina) dan darah Rusa Bawean sejumlah dua sampel (satu ekor jantan dan satu ekor betina) yang diperoleh dan disetujui oleh Taman Safari Indonesia II Prigen.
- 2) DNA diisolasi dari darah Rusa Timor dan Rusa Bawean menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*.

- 3) Amplifikasi DNA gen Cox-2 (*Cytochrome c oxydase subunit 2*) Rusa Timor dan Rusa Bawean dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan sepasang primer dari database NCBI *Genebank*: Forward (Cox-2) 5,, GCACAATAGACGCTCAAGAG"3 dan Reverse (Cox-2) 5,,GAAGCT GTGATTTGATCCGC"3. Primer didesain dengan menggunakan Primer 3 Plus.
- 4) Metode PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *Biorat* melalui proses: pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) 52,8°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
- 5) Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *dideoksi sanger* berdasarkan *dye terminator labelling* menggunakan sepasang primer Forward (Cox-2\_F) 5,, GCACAATAGACGCTCAAGAG "3 dan Reverse (Cox-2\_R) 5,,GAAGCT GTGATTTGATCCGC"3.
- 6) Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan penyejajaran hasil sekuen DNA Rusa Timor terhadap Rusa Bawean dan *Reference Genebank Cervus timorensis* menggunakan program *Bioedit* dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI, serta perhitungan jarak genetik dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA (*Molecular evolutionary Genetics Analysis*).

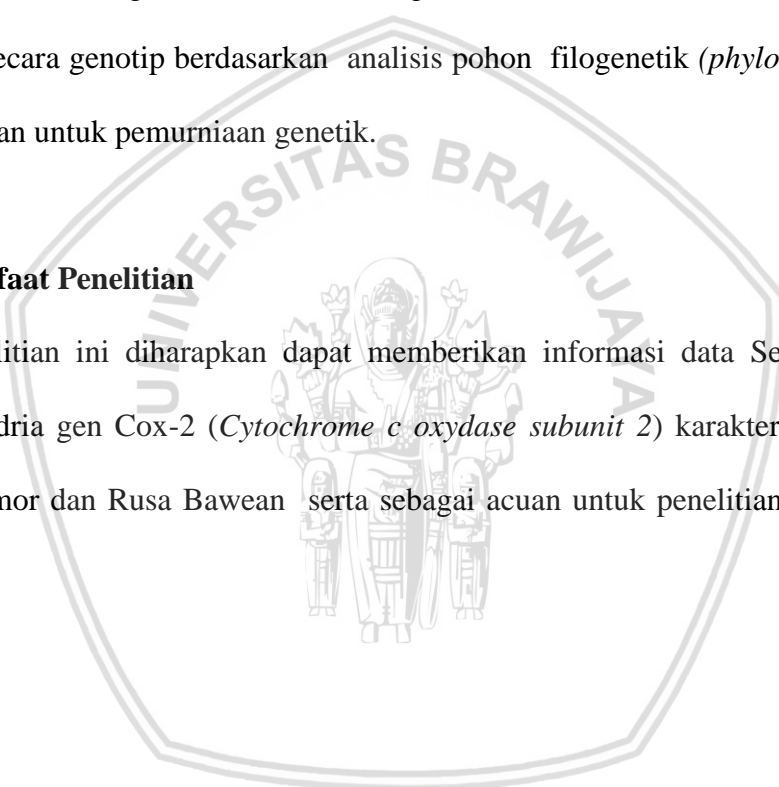
#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Untuk mengetahui susunan nukleotida Rusa Timor dan Rusa Bawean berdasarkan sekuen gen COX-2 (*Cytochrome oxydase subunit 2*).
- 2) Untuk mengetahui karakteristik genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean secara genotip berdasarkan analisis pohon filogenetik (*phylogenetic tree*) dan untuk pemurniaan genetik.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi data Sekuens DNA Mitokondria gen Cox-2 (*Cytochrome c oxydase subunit 2*) karakteristik genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean serta sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut







## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Rusa Timor (*Cervus timorensis*)

Rusa timor merupakan salah satu rusa asli Indonesia selain rusa bawean, sambar, dan menjangan. Rusa timor yang mempunyai nama latin *Cervus timorensis* diperkirakan asli berasal dari Jawa dan Bali, kini ditetapkan menjadi fauna identitas provinsi Nusa Tenggara Barat (NTB). Rusa timor sering juga disebut sebagai rusa jawa. Rusa timor mempunyai ukuran tubuh yang kecil, dengan berat badan rusa timor dewasa mencapai 60 - 100 kg, tungkai pendek, ekor panjang, dahi cekung, gigi seri relatif lebih besar, dan rambut berwarna coklat kekuning-kuningan (**Gambar 2.1**). (Semiadi, dkk. 2004). Berikut ini merupakan taksonomi dari Rusa Timor :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Class : Mammalia  
Ordo : Artiodactyla  
Family : Cervidae  
Sub-Family : Cervinae  
Genus : *Cervus*  
Species : *Cervus timorensis*



**Gambar 2.1** Gambar Rusa Timor (Wikimedia commons, 2007)

Rusa timor dapat hidup selama 15 – 20 tahun di alam maupun di penangkaran, dengan rerata masa hidup 17,5 tahun. Rusa memiliki kelebihan dibandingkan dengan hewan ruminansia lain. Ancaman bagi rusa timor di habitat alaminya adalah perburuan, perdagangan ilegal, dan kerusakan habitat (Pattiselanno, 2009.). Salah satu upaya untuk menjaga keberadaan rusa timor yaitu dengan melakukan upaya penangkaran untuk mengantisipasi kepunahan rusa. Berdasarkan Kategori IUCN sejak tahun 2008 rusa timor termasuk *vulnerable* adalah status konservasi yang diberikan kepada spesies yang sedang menghadapi risiko kepunahan di alam liar pada waktu yang akan datang.

Rusa timor merupakan satwa yang perkawinannya bersifat poligamus yakni seekor pejantan dapat mengawini beberapa ekor betina dalam satu siklus perkawinan. Sub spesies ini mempunyai tingkat reproduksi tinggi dimana dengan pemeliharaan yang baik, persentase kelahiran anak dapat mencapai 85-96,07%. Umumnya rusa mengalami dewasa kelamin pada usia 15 – 18 bulan.

Kelahiran pada rusa tropis terjadi sepanjang tahun (Semiadi, dkk. 2004). Menurut Daud (2011), musim kelahiran pada rusa timor umumnya terjadi pada bulan April–Juni, sedangkan di Jawa pada bulan September, Flores pada bulan Maret serta Sulawesi pada Januari dan Agustus. Rata-rata jumlah anak yang dilahirkan dalam setiap kelahiran adalah satu.

## 2.2 Rusa Bawean (*Axis kuhlii*)

Rusa Bawean merupakan Rusa endemik dari Pulau Bawean yang terletak di sebelah selatan kota Gersik Provinsi Jawa Timur. Rusa Bawean memiliki nama latin yaitu *Axis kuhlii*. Rusa Bawean memiliki tubuh yang relatif lebih kecil dibandingkan Rusa jenis lainnya dengan tinggi tubuh antara 60-70 cm dan panjang tubuh antara 105-115 cm. Rusa endemik Pulau Bawean ini mempunyai bobot antara 15-25 kg untuk rusa betina dan 19-30 kg untuk rusa jantan. Rusa Bawean pertama kali diidentifikasi pada tahun 1845 sebagai *Cervus Kuhlii*. Bemmell (Semiadi, dkk. 2004) menyebutkan tentang klasifikasi rusa Bawean adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Ordo	: Artiodactyla
Family	: Cervidae
Subfamily	: Cervinae
Genus	: <i>Axis</i>
Spesies	: <i>Axis Kuhlii</i>

Rusa Bawean jantan dewasa mempunyai sepasang tanduk bercabang tiga (**Gambar 2.2**), sedangkan rusa jantan muda ranggahnya belum bercabang. Rusa Bawean jantan tampak samping, Ranggah mulai tumbuh pada saat rusa berumur 8 bulan. Mula-mula berupa tonjolan disamping dahinya, kemudian memanjang dan tumbuh lengkap pada umur 20-30 bulan. Selanjutnya ranggah ini akan tanggal dan digantikan oleh sepasang ranggah yang lain dengan satu cabang demikian seterusnya sampai tanduk tersebut lengkap bercabang tiga, yaitu pada saat rusa berumur 7 tahun. Rusa Bawean mempunyai masa kehamilan antara 225-230 hari dan melahirkan satu anak dalam masa satu kehamilan (Garsetiasih dan Mariana, 2002).

Populasinya rusa ini sangat kecil dan kurang dari 250 ekor spesies dewasa, IUCN *Redlist* sejak tahun 2008 memasukkan Rusa Bawean dalam kategori (CR; *Critiscally Endangered*) atau “sangat terancam kepunahan”. Pada status CITES juga mengelompokkan rusa ini dalam *Appendix I*. Penurunan jumlah populasi ini mendorong berbagai usaha konservasi diantaranya pembentukan Suaka Margasatwa Pulau Bawean seluas 3.831,6 ha sejak tahun 1979 (Tohari, dkk. 2011).



**Gambar 2.2** Gambar Rusa Bawean (Wikimedia commons, 2007)

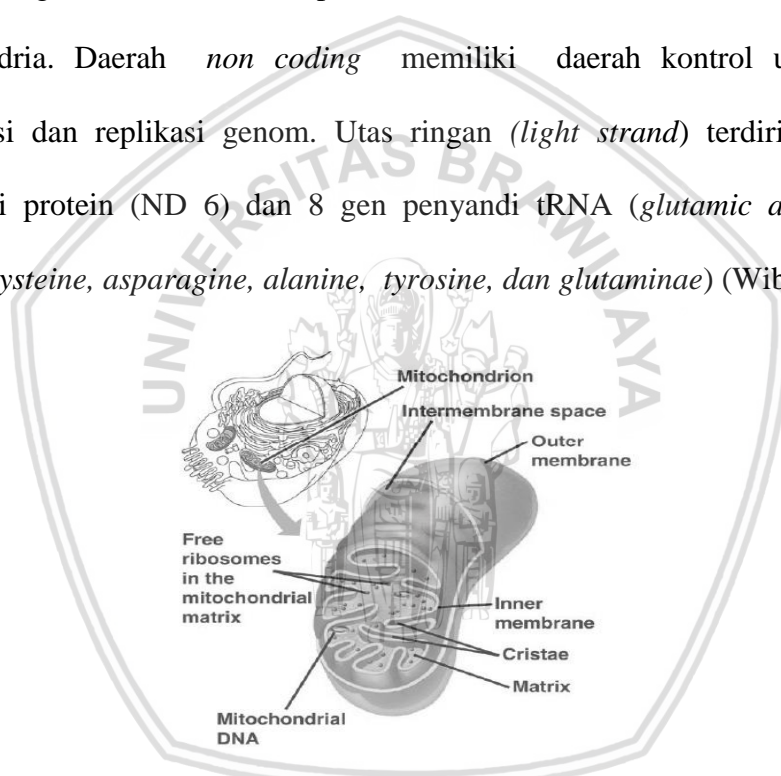
### 2.3 DNA Mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria (mtDNA) adalah DNA berantai ganda yang berbentuk sirkuler dan terdiri dari DNA utas ringan (*light strand*) yang kaya dengan sitosin dan utas berat (*heavy strand*) yang kaya dengan guanin. Mitokondria terdapat pada sel tumbuhan dan hewan, merupakan struktur berbentuk batang yang tertutup dalam dua membran yaitu membran luar dan membran dalam (**Gambar 2.3**). Membran luar memiliki struktur halus seperti membran dalam dengan jumlah fosfolipid yang hampir sama sebagai protein. Membran luar bersifat permeable terhadap molekul nutrisi, ion, dan molekul ATP ADP (Widowati, 2013). Mitokondria memiliki perangkat genetik yang disebut DNA mitokondria (mtDNA), terletak pada matriks semi cair di bagian paling dalam mitokondria. Satu mitokondria dapat mengandung puluhan mtDNA. Fungsi mtDNA adalah untuk mengkode sintesis protein spesifik. mtDNA dapat bereplikasi sehingga dalam satu organel bisa berjumlah lebih dari satu.

MtDNA merupakan DNA yang relative mudah untuk dilakukan amplifikasi karena memiliki banyak kopian di sel. Konten dari mtDNA tersimpan baik di setiap hewan, dengan sedikit duplikasi, tidak memiliki intron, dan memiliki intergenic regions yang pendek. MtDNA diturunkan secara maternal sehingga disebut klonal. MtDNA memiliki properti biologi yang spesifik, sehingga dapat digunakan sebagai marker untuk keanekaragaman hayati berbasis molekular (Galtier, 2009). Berdasarkan fungsi yang dimiliki, mtDNA terdiri dari daerah penyandi (*coding region*) dan daerah bukan penyandi (*non coding region*).



Daerah *coding* memiliki 37 gen penyandi, terdiri atas 22 gen penyandi transfer RNA (tRNA), dua gen penyandi ribosomal RNA (rRNA), dan 13 gen penyandi protein. Gen penyandi protein terdiri atas tiga subunit sitokrom oksidase (CO) I-III, tujuh subunit NADH-dehidrogenase, dua subunit ATPase, dan sitokrom b (Cyt-b). Gen penyandi protein ini berfungsi untuk mengkode pembentukan protein yang terlibat dalam transport elektron dan reaksi fosforilasi oksidatif dari mitokondria. Daerah *non coding* memiliki daerah kontrol untuk proses transkripsi dan replikasi genom. Utas ringan (*light strand*) terdiri dari 1 gen penyandi protein (ND 6) dan 8 gen penyandi tRNA (*glutamic acid, proline, serine, cysteine, asparagine, alanine, tyrosine, dan glutaminae*) (Wibowo, 2009).



**Gambar 2.3** DNA Mitokondria (Susmiarsih, 2010).

Variasi merupakan ciri-ciri umum yang terdapat di dalam suatu populasi. Keragaman terjadi tidak hanya antar bangsa tetapi juga di dalam satu bangsa yang sama, antar populasi maupun di dalam populasi, di antara individu tersebut (Mahmud, 2014). Analisa variasi DNA, terutama mitokondrial DNA (mtDNA) banyak digunakan untuk merekonstruksi hubungan filogenetik antar jenis atau antar populasi dalam jenis yang sama. Hal ini karena mtDNA memiliki laju



mutasi yang lebih tinggi (5-10 kali) dibandingkan dengan DNA inti (Khan, *et al.* 2008).

#### 2.4 COX-2 (Cythochrome c oxydase subunit 2)

Cytochrome c oxydase subunit 2 (Cox-2) merupakan enzim mitokondria terdiri atas cythchrome c oksidase I, II dan III. Cox-2 dapat digunakan sebagai DNA barcoding telah digunakan diantaranya pada jenis burung di Amerika utara dan jenis burung yang telah di barcoding tersebut dilaporkan berjumlah (260- 667 spesies) (Moritz and Cicero, 2004). Cox-2 merupakan gen kandidat sebagai DNA barcoding karena memiliki konsentrasi sekuens asam amino yang tinggi dan besar kemampuan pada primer yang digunakan. Cox-2 merupakan resolusi dalam mengetahui keanekaragaman pada semua jenis hewan. Selain itu gen Cox-2 mutasinya lebih besar dibandingkan dengan 12S dan 16S (Hebert, *et al.* 2003).

Gen Cox-2 ini memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam menentukan identitas sebuah spesies untuk hampir semua binatang tingkat tinggi. Berikut ini adalah kelebihan yang dimiliki oleh gen Cox-2 dibandingkan dengan gen yang lainnya (Johannes, *et al.*, 1995).

1. Panjang seluruh gen ini relatif pendek, yaitu hanya sekitar 648 bp
2. Relatif stabil tidak mudah mengalami perubahan bila dibandingkan dengan gen-gen mitokondria yang sejenis
3. Gen ini sangat cocok untuk menentukan identitas sebuah spesies karena mempunyai variabilitas yang rendah (1-2%)

4. Gen ini memiliki jumlah *copy* yang banyak sehingga mudah di amplifikasi dibandingkan dengan gen-gen yang berasal dari gen inti.

## 2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* menggunakan enzim *Taq Polymerase*. Hal ini dapat meningkatkan jumlah urutan DNA hingga  $10^6$  -  $10^7$  kali. Dalam satu siklus PCR, akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. PCR merupakan metode untuk memaksimalkan amplifikasi DNA target dan bukan urutan non-target. Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. PCR digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *Genetic profiling in forensic, legal and bio-diversity applications*, biologi evolusi, *site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA Quantitation* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah, 2008).

Target PCR yaitu asam nukleat (DNA) untai ganda yang diekstraksi dari sel dan terdenaturasi menjadi asam nukleat beruntai tunggal. Komponen reaksi PCR terdiri atas pasangan primer berupa oligonukleotida spesifik untuk target gen yang dipilih, enzim (*Taq polymerase*, enzim *thermostable* dan *thermoactive* yang berasal dari *Thermus aquaticus*), ion logam bivalen umumnya  $Mg^{++}$  berfungsi sebagai kofaktor bagi enzim DNA *polymerase*, dan *triphosphat deoxynucleoside* (dNTP) digunakan untuk amplifikasi target gen secara eksponensial dengan hasil replikasi ganda dari target awal. Reaksi dilakukan

dalam suatu mesin pemanas yang diprogram secara otomatis disebut *thermocycler*. Mesin tersebut menyediakan kondisi termal yang diperlukan untuk proses amplifikasi (Nollet and Toldrá, 2011). Satu siklus PCR terdiri atas pra denaturasi, denaturasi, penempelan (*annealing*), pemanjangan rantai (*extension*), dan *post extension*.

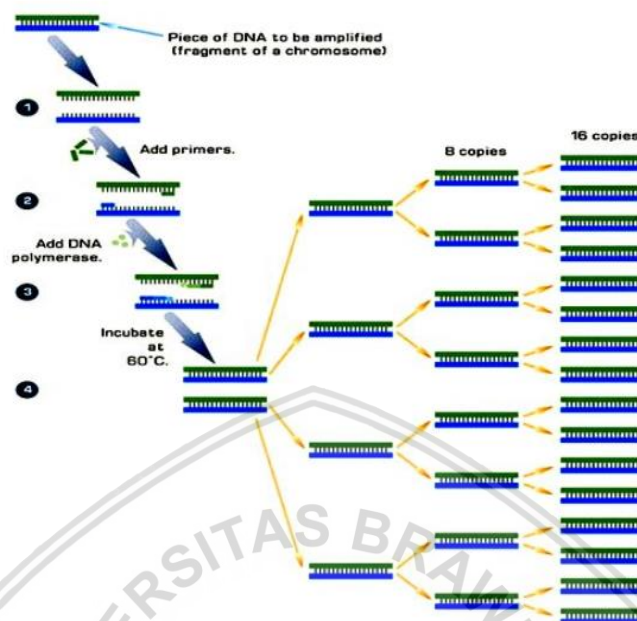
Keberhasilan reaksi PCR ditentukan oleh beberapa factor yaitu, *deoksiribonukleotida triphosphat* (dNTP), oligonukleotida primer, DNA *template* (cetakan), komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Oligonukleotida primer (desain primer) memegang peranan penting untuk spesifisitas maksimal dan efisiensi PCR (Sasmito dkk., 2014).

Primer yang baik ditentukan oleh beberapa karakter primer yang baik menurut Sasmito dkk. (2014) antara lain: Panjang primer berkisar 16-28 basa, *Temperature melting* ( $T_m$ ) atau suhu leleh yang tepat untuk disosiasi dalam melepas ikatan, *Temperature annealing* ( $T_a$ ) atau suhu penempelan yang stabil untuk berikatan dengan template DNA, Selisih suhu leleh yang rendah dengan suhu maksimum 5°C agar tidak terjadi penurunan proses amplifikasi, *GC Content* atau jumlah total GC dalam satu untai primer yang berkisar 40% sampai 60%, karena basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen sehingga dianggap lebih stabil dalam mengikat templat dibandingkan basa A dan T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen, dan *GC Clamp* yaitu kondisi ujung 3' pada primer memiliki basa GC agar hibridasi lebih stabil.

## 2.6 Amplifikasi PCR

Menurut Santella (2006) proses PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi 95°C selama 1-2 menit, penempelan (*annealing*) 52,8°C selama 1-2 menit, ekstensi 72°C selama 1,5 menit. Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut (Weissensteiner *et al.*, 2004). Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet. Menurut Handoyo dan Ari (2000), Amplifikasi urutan yang diinginkan dilakukan menggunakan sepasang primer oligonukleotida yang spesifik untuk membuat hibrid dengan ujung -5' menuju ujung -3' untai DNA target.

Siklus PCR terjadi rangkaian proses denaturasi (1), annealing (2), dan elongasi (3) hingga terhitung siklus pertama selesai (4) (**Gambar 2.4**). Reaksi-reaksi tersebut diulangi lagi dari 25 – 30kali (siklus) sehinggalah pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru dan merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (Yusuf, 2010).



**Gambar 2.4** Skema satu siklus PCR (Yusuf, 2010).

### 2.6.1 Denaturasi

Denaturasi DNA adalah proses menjadikan DNA untai tunggal dari DNA untai ganda yang dibuka. Denaturasi awal ini dilakukan sebelum enzim taq polymerase ditambahkan (Yusuf, 2010). Denaturasi awal dilakukan selama 1-3 menit diperlukan untuk meyakinkan bahwa DNA telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. Denaturasi yang tidak berlangsung secara sempurna dapat menyebabkan utas DNA terputus. Tahap denaturasi yang terlalu lama dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polimerase (Triwibowo, 2010).

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target pada untai ganda DNA, jikadiperlukan suhu yang lebih tinggi jika sekuen target kaya akan Guanin-Sitosin. Aktivitas enzim taq polimerasi akan hilang atau berkurang aktifitasnya akibat suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama.

Waktu paruh aktivitas enzim *taq polymerase* adalah >2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C dan lima menit pada suhu 97,5°C (Sulistyaningsih, 2007).

### 2.6.2 Annealing

*Annealing* adalah penempelan primer. Oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang komplementer dengan sekuen primer. Primer *annealing* berkaitan dengan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi suhu yang digunakan dimulai dengan menghitung *Temperature Melting* ( $T_m$ ) dari ikatan pada primer dan DNA template. Cara mudah menghitung bisa menggunakan rumus  $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$ . Suhu *annealing* biasanya 5°C di bawah  $T_m$  primer yang sebenarnya. Secara sederhana  $T_m$  dipengaruhi oleh DNA template, komponen buffer, dan konsentrasi primer (Fatchiyah, 2008).

Panjang primer berkaitan dalam penentuan waktu untuk proses *annealing*. Panjang primer 18-22 basa membutuhkan waktu 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa membutuhkan waktu *annealing* 60 detik. Suhu *annealing* secara umum yang digunakan berkisar antara 37-60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan  $T_m$  primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan  $(T_m - 5)^\circ\text{C}$  sampai dengan  $(T_m + 5)^\circ\text{C}$ . Keberhasilan suatu proses PCR ditentukan oleh eksperimen dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan serta perlu memperhatikan *mispriming* pada daerah target dan non-target (Handoyo, 2000).



### 2.6.3 Extension

Proses pemanjangan untai baru DNA terjadi pada proses ini, posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Pembacaan informasi DNA yang diinginkan akan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan pada siklus berikutnya sehingga jumlah DNA target menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus. DNA target meningkat secara eksponensial, sehingga setelah 30 siklus akan menjadi milyaran amplifikasi DNA target (Triwibowo, 2010). Setiap satu kilobase (1000 bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit, bila kurang dari 500 bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu dua menit di setiap siklusnya (Fatchiyah, 2008).

## 2.7 Desain Primer

Desain primer yang baik sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR. Pertimbangan desain yang penting diuraikan di bawah ini sebagai kunci untuk amplifikasi spesifik dengan hasil tinggi:

### 1. Panjang primer

Panjang optimal primer PCR adalah 18-22 basa. Jika panjang primer kurang dari 18 basa dapat mengakibatkan spesifitas primer rendah, sedangkan panjang primer lebih dari 22 basa tidak akan meningkatkan spesifitas primer secara bermakna (Marlina dkk., 2015).



## 2. *Primer Melting Temperature*

Temperatur ini diperlukan oleh separuh primer dupleks mengalami disosiasi/lepas ikatan. Primer yang ideal memiliki  $T_m$  berkisar 52-58°C, untuk  $T_m$  diatas 65°C akan mengurangi efektifitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA berjalan kurang baik (Widowati, 2013).

## 3. *Primer Annealing Temperature*

Temperatur ini merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan template (DNA) dengan stabil (DNA-DNA hybrid stability). Jika suhu tinggi primer akan sulit berikatan dengan DNA, sedangkan jika suhu rendah primer akan berikatan dengan DNA template yang tidak spesifik.

## 4. Kandungan GC

Jumlah basa G dan C sebaiknya berkisar 40-60%. Primer dengan GC rendah tidak dapat berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat tujuan, sedangkan primer dengan komposisi GC terlalu tinggi dapat menyebabkan hasil menjadi tidak spesifik (Marlina dkk., 2015).

## 5. GC Clamp

Dimana jumlah basa G dan C terdapat pada 5 basa terakhir (3"). GC clamp yang baik sekitar 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C.

## 6. Struktur sekunder (*hairpin*, *self-dimer*, *cross-dimer*)

*Self-dimer* merupakan ikatan yang terbentuk dimana satu primer berikatan dengan primer itu sendiri yaitu primer *forward* dengan *forward* atau *reverse* dengan *reverse*.

*Cross-dimer* merupakan ikatan dimana satu primer berikatan dengan primer lainnya yaitu primer *forward* dengan primer *reverse* (Marlina dkk., 2015).

### 7. Primer Tm Pair Mismatch

*Temperature melting* dari sepasang primer memiliki perbedaan tidak lebih dari 5°C.

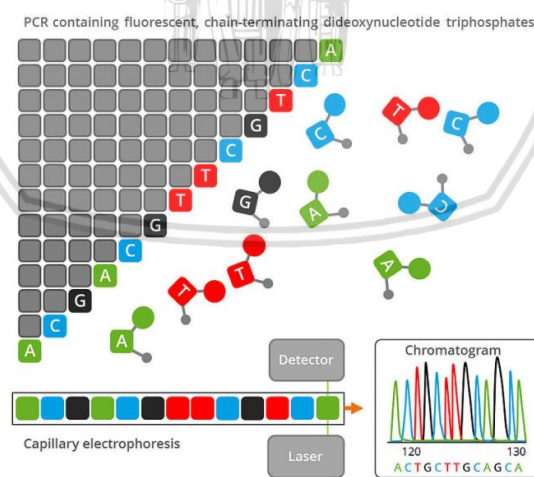
## 2.8 Sekuen DNA

Sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA. Metode yang umum digunakan saat ini adalah metode Sanger (*chain termination method*) yang telah dimodifikasi menggunakan *dyedideoxy terminator*, dimana proses awalnya adalah reaksi PCR dengan pereaksi yang agak berbeda, yaitu hanya menggunakan satu primer dan adanya tambahan *dideoxynucleotide* yang dilabel *fluorescent*. Karena warna *fluorescent* untuk setiap basa berbeda, maka urutan basa suatu DNA yang tidak diketahui bisa ditentukan (Widowati, 2013). Metode tersebut berdasarkan pada penggunaan dideoksinukleotida trifosfat (ddNTPs). Dideoksinukleotida trifosfat akan menghentikan proses polimerasi apabila melekat pada ujung trifosfat untai DNA (Klug and Cummings, 2003).

Prinsip utama metode Sanger adalah penggunaan trifosfat dideoxynucleotide (ddNTPs) sebagai terminator rantai DNA (**Gambar 2.5**). Metode penghentian pemanjangan untai rantai DNA membutuhkan templat DNA beruntai tunggal, primer DNA, DNAPolimerase, radioaktif atau fluoresen dengan label nukleotida, dan nukleotida termodifikasi. Sampel DNA dibagi menjadi empat urutan reaksi terpisah yang mengandung keempat standar deoxynucleotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dan DNA polimerase. Untuk setiap reaksi ditambahkan hanya satu dari empat dideoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) yang merupakan rantai yang menghentikan nukleotida. Fragmen DNA yang baru disintesis dan diberi label dan dipisahkan oleh ukuran dengan elektroforesis gel pada gel

*polyacrylamide-urea denaturing* dengan masing-masing dari empat reaksi berjalan di salah satu dari empat jalur individu (jalur A, T, G, C), pita DNA saat itu divisualisasikan dengan autoradiografi atau sinar UV, dan urutan DNA dapat dibaca secara langsung pada film sinar-X atau gambar gel. Sebuah band gelap di jalur menunjukkan fragmen DNA yang merupakan hasil dari penghentian rantai setelah penggabungan dideoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP). Posisi relatif dari pita yang berbeda di antara keempat jalur tersebut kemudian digunakan dan dibaca (dari bawah ke atas) sesuai urutan DNA (Gatc-biotec.com, 2017).

Hasil sekuen urutan DNA dapat dilakukan secara *online* dan sederhana dengan BLAST. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) merupakan sebuah algoritma untuk membandingkan informasi urutan biologis primer, seperti nukleotida urutan DNA materi genetik yang sudah ada dalam *Database* (Fatchiyah, 2015).



**Gambar 2.5** Skema sekuensing DNA metode Sanger (Gatc-biotec.com, 2017).



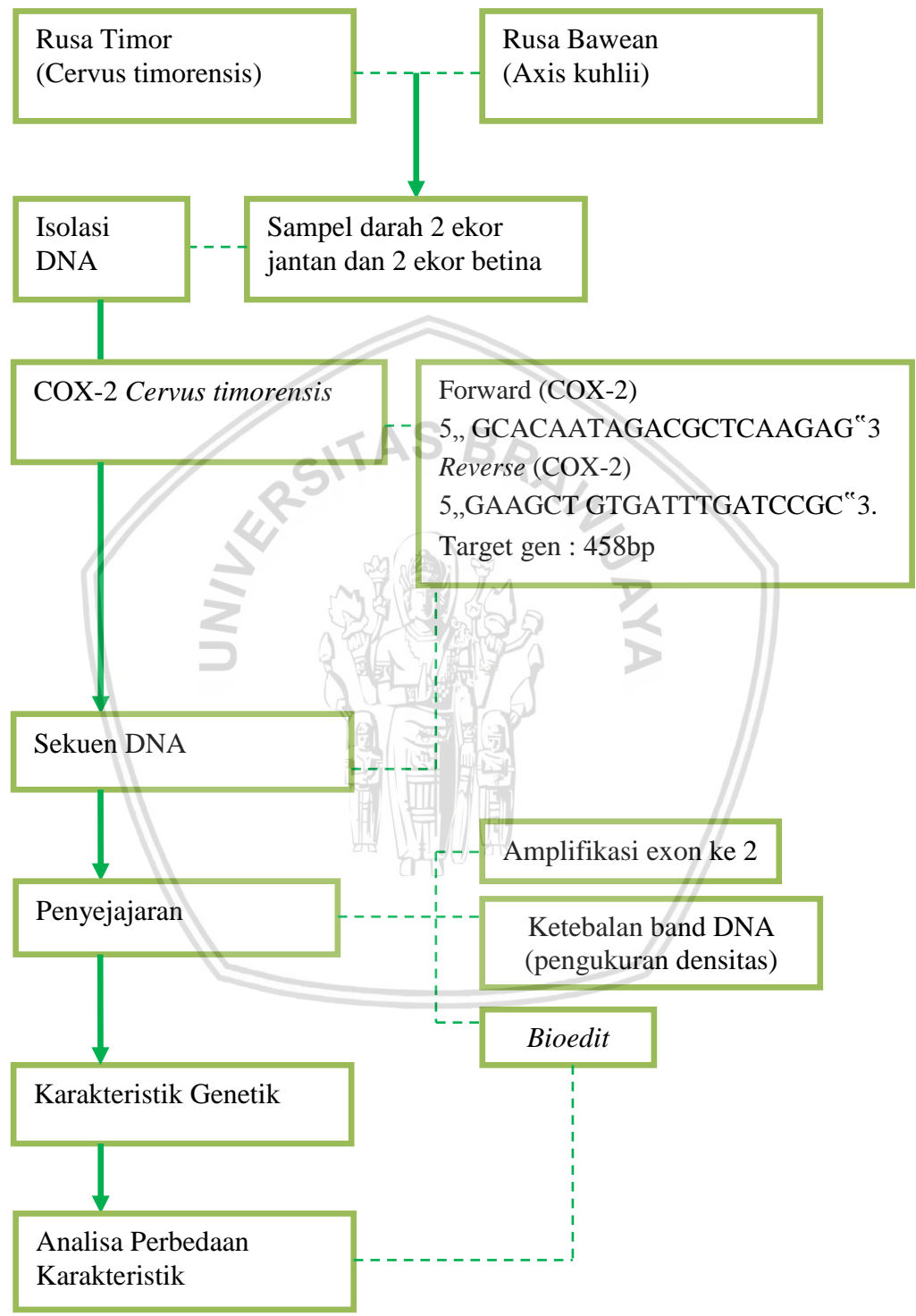
## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep

Karakteristik genetik dari Rusa Timor dan Rusa Bawean dapat diketahui dengan melihat ekspresi gen Cox-2 (**Gambar 3.1**). Gen Cox-2 sering digunakan untuk analisis filogenetik dalam spesies yang dapat menentukan kekerabatan genetik antar spesies serta dapat mengelompokkan gen individu dalam suatu keluarga yang menggambarkan bagaimana gen dapat berhubungan antar spesies dalam satu keluarga. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Gilbert Clement (2006) didapatkan sekuens genom mitokondria lengkap dari Rusa Timor. Karakteristik genetik dari Rusa Timor dan Rusa Bawean dapat dilakukan dengan menyelaraskan sekuens gen yang didapatkan dengan data *genebank* pada NCBI dengan kode referensi sekuens KY117575.1.

Sampel darah yang digunakan berasal dari Rusa Timor dan Rusa Bawean untuk mendapatkan isolat DNA. Amplifikasi DNA dengan metode PCR berdasarkan sepasang primer gen Cox-2 dengan target gen 458 bp dari Cds: 1140 bp. Sekuen produk PCR memunculkan grafik fragmen DNA yang berguna dalam penyelarasan *alignment* basa nukleotida Rusa Timor dan Rusa Bawean. Penyelarasan tersebut menghasilkan karakteristik genetik dan/atau kesamaan genetik untuk dianalisa perbedaan susunan basa asam nukleotida pada genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean.

### 3.2 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Sekuen gen Cox-2 (*Cytochrome oxidase subunit 2*) DNA Mitokondria dapat digunakan untuk mengetahui susunan nukelotida Rusa Timor.
2. Analisis sekuen gen Cox-2 (*Cytochrom oxidase subunit 2*) DNA Mitokondria dapat digunakan untuk melihat karakteristik genetic Rusa Bawean.









## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Lokasi pengambilan sampel darah Rusa Timor dan Rusa Bawean di Taman Safari 2 Prigen, Pasuruan, Jawa Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk pemesanan primer, serta Laboratorium ADD (*Animal diagnostic disease*) untuk pelaksanaan PCR pada bulan Februari 2018-Maret 2018.

### 4.2 Sampel Penelitian

Pengambilan sampel darah Rusa Timor dan Rusa Bawean di Taman Safari 2 Prigen, Pasuruan, Jawa Timur. Rusa Timor dan Rusa Bawean yang digunakan sebagai sampel telah mencapai usia dewasa yaitu lebih dari 3 tahun. Sampel yang diambil berupa 2 individu jantan dan 2 individu betina. Tabel 4.1 menunjukkan informasi individu sampel Rusa Timor dan Rusa Bawean.

**Tabel 4.1 Informasi Individu Sampel Rusa Timor dan Rusa Bawean**

No	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Silsilah Keluarga	Simbol
1	B04001 RT	4	Betina	TSI 2	12D
2	B03003 RT	5	Jantan	TSI 2	13D
3	B05006 RB	3	Betina	TSI 2	14D
4	B05005 RB	3	Jantan	TSI 2	15D

### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, sarung tangan, masker, *ice box*, kertas label, tabung EDTA, *microsentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, mesin penangas, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, ND-1000 *Spectrophotometer*, *Mupid-Exu Electrophoresis*, kamera dan tisu. Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu 2 sampel darah Rusa Timor jantan betina dan 2 sampel Rusa Bawean jantan betina, *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50), ddH<sub>2</sub>O, primer, *Forward* (COX-2\_F) 5,, GCACAATAGACGCTCAAGAG "3 dan *Reverse* (COX-2\_R) 5,,GAAGCT GTGATTTGATCCGC"3. PCR *mix* (Promega *Gotaq Green Master Mix*), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1 x), agarosa 1% dan 2%, *loading dye*, ethanol absolut, alkohol 70%, aluminium foil, larutan etidium bromida (EtBr) dan natrium asetat 3M.

### 4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Pemilihan sampel darah Rusa Timor dan Rusa Bawean
2. Pengambilan sampel berupa darah Rusa Timor dan Rusa Bawean
3. Isolasi DNA
4. Uji kuantitas dan kualitas DNA total
5. Desain primer
6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

7. Uji kuantitas dan kualitas produk PCR
8. Purifikasi produk PCR
9. Sekuensing DNA produk PCR
10. Analisa data

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat komparatif dengan melihat perbandingan sekuen gen *Cox-2 (Cytochrome c oxydase subunit 2)* antara Rusa Timor dan Rusa Bawean. Data penelitian yang didapat dianalisa secara kualitatif dengan mendeskripsikan hal-hal yang ditemukan pada hasil penelitian. Sampel darah sebanyak delapan sampel merupakan darah yang diambil dari empat individu Rusa Timor dan Rusa bawean. Sampel darah tersebut kemudian dilakukan pengisolasian DNA dengan menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*. Hasil isolasi DNA akan diukur konsentrasinya dengan spektrofotometri dan pengukuran menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA hasil dari isolasi akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *Forward (COX-2\_F)* 5', GCACAATAGACGCTCAAGAG '3 dan *Reverse (COX-2\_R)* 5', GAAGCT GTGATTTGATCCGC'3. Ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Kemudian produk PCR disekuensing dengan metode *Sanger*. Hasil sekuen fragmen DNA tersebut disejajarkan dengan menggunakan *nucleotide BLAST* pada NCBI dan *software Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.2.6*. Penyejajaran nukleotida akan dipairwise untuk mendapatkan angka jarak kekerabatan menggunakan *software Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* 6.0.6. Angka tersebut akan digunakan untuk

menganalisa seberapa dekat kekerabatannya dengan pohon filogenetik (*phylogenetic tree*).

## **4.6 Prosedur Kerja**

### **4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Rusa Timor dan Rusa Bawean**

Lokasi pengambilan sampel darah dilakukan pada vena jugularis. Volume sampel darah yang diambil sebanyak 2cc dari masing-masing empat individu Rusa Timor dan Rusa Bawean. Sampel darah dimasukkan ke dalam EDTA *vacutainer tube* dan dilabel sesuai nama individu kode hewan. Sampel kemudian disimpan pada suhu 4°C. Penyimpanan sampel *whole blood* pada suhu 4°C dipilih karena jarak antara pengambilan sampel dan proses isolasi DNA tidak terlalu lama (Bulla, *et al.* 2016).

### **4.6.2 Isolasi DNA**

Isolasi DNA dari sampel darah Rusa timor dan Rusa bawean menggunakan *Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit*. Terdapat tiga langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu merusak dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

### **1.6.3 Uji Kuantitas DNA**

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin ND-1000 *Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O. ddH<sub>2</sub>O ditetaskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1µL, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 1 µL sampel ditetaskan diatas pedestal submicroliter cell yang telah

dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah ditetaskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (*Nanodrop Technologies*, 2007).

#### 1.6.4 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen Cox-2. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook and Russel (2001). Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 mL dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarosa larut. Menurut Fatchiyah dkk., (2009) campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1  $\mu$ L dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Campuran agarosa, TBE 1x dan EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu kamar hingga memadat baru kemudian diambil sisir secara perlahan. Gel dengan sumuran yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan buffer elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan kedalam *chamber* hingga menutupi seluruh bagian gel. *Marker* (DNA ladder) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran. Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur selanjutnya. *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt



selama 30 menit. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan gel diangkat dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis (Fatchiyah dkk, 2009).

### 1.6.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : KY117575.1 Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data KY117575.1 1.140 bp *linear* DNA. *Cervus timorensis* *gen cox-2*. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *Forward* (COX-2\_F) 5,, GCACAATAGACGCTCAAGAG "3 dan *Reverse* (COX-2\_R) 5,,GAAGCT GTGATTTGATCCGC"3. dengan target produk PCR 458 bp.

### 1.6.6 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari Rusa Timor dan Rusa Bawean diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (COX-2\_F) dan *reverse* (COX-2\_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1µL DNA, 1µL primer *forward* 10pmol, 1µL primer *reverse* 10pmol, 5µL PCR mix dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 52,8°C selama 30 detik.

Extension pada suhu 72°C selama 1 menit dan post extension pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

### 1.6.7 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen Cyt-b dari darah Rusa Timor dan Rusa Bawean, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Sebanyak 2 µL produk PCR ditambahkan 2 µL *loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR tube. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transiluminator.

### 1.6.8 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi pada produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix meliputi dNTPs, Taq Polimerase, ion Mg, serta ddH<sub>2</sub>O dan primer yang berada didalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol *Santella*.

### 1.6.9 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen Cox-2 dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer Cox-2 \_F 10pmol dan Cox-2\_R 10pmol untuk melihat sekuen Gen Cyt-b sebesar 458 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50ng/ $\mu$ L untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

### 1.6.10 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini kemudian dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara empat Rusa Timor dan Rusa Bawean melalui homologi gen Cox-2 dengan menggunakan software *BioEdit* dan BLAST NCBI. Tahap analisis sekuensing DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel 12D, 13D, 14D dan 15D dengan database NCBI *Genbank* :. KY117575.1 penyejajaran menggunakan algoritma *Clustal W multiple allignment*. Ketebalan DNA diukur menggunakan *software image j* dari sampel menjadi bentuk densitogram sehingga dapat diketahui luas area puncak masing-masing band DNA.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA Rusa Timor dan Rusa Bawean

Isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel *wholeblood* dari Rusa Timor dan Rusa Bawean dengan menggunakan *QI Aamp® DNA Mini Kit* sesuai protokol. Kuantitas DNA diukur menggunakan alat *Implen Nanophotometer® Pearl ND-100* pada panjang gelombang 260nm. Pengukuran jumlah DNA didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultraviolet (UV) yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, dan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Muladno, 2002). Konsentrasi dan kemurnian DNA total dari Rusa Timor dan Rusa Bawean ditunjukkan pada **Tabel 5.1**. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA berdasarkan uji kuantitas tersebut dapat digunakan untuk menguji gen Cox-2 dengan teknik PCR.

**Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rusa Timor dan Rusa Bawean**

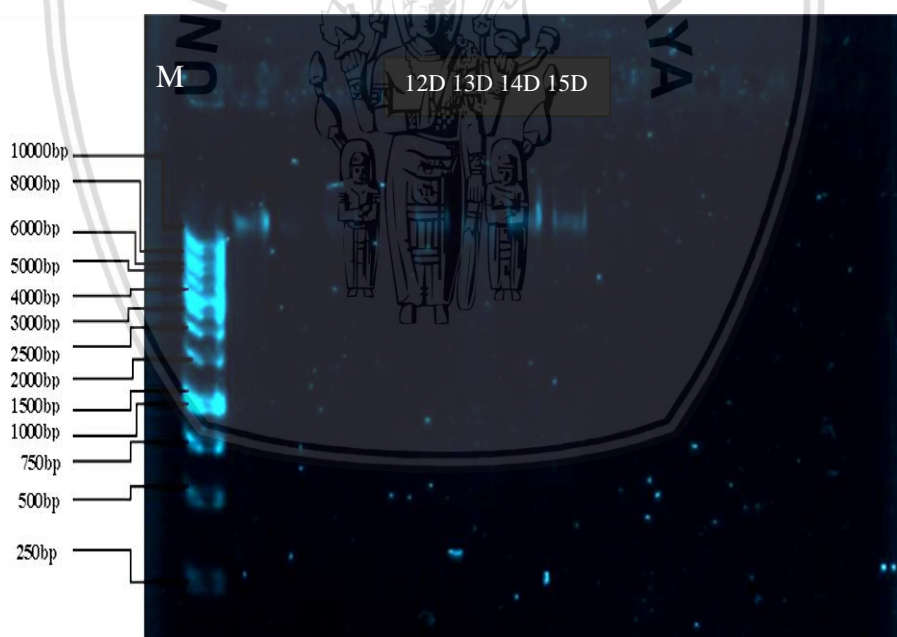
Sampel	Kemurnian (Absorbansi 260/280)	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)
B04001 RT	0,85	139.19
B03003 RT	0,99	14.90
B05006 RB	1.09	12.83
B05005 RB	0.88	95.05

Menurut PROMEGA (2017) kualitas DNA yang baik memiliki rasio absorbansi 260/280 berkisar 1,8-2,0. Nilai kemurnian DNA pada seluruh sampel menunjukkan tingkat kemurnian di bawah 1,8. Menurut Muladno (2002), nilai kemurnian DNA lebih kecil dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi dengan protein. Sedangkan nilai kemurnian lebih besar dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA (Santella, 2006). Konsentrasi DNA yang rendah pada hasil isolasi sampel tersebut tidak mempengaruhi amplifikasi DNA. Chen and Janes (2002) mengatakan bahwa amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sampel (DNA) berkonsentrasi rendah. Hasil isolasi DNA dengan kemurnian rendah dapat diamplifikasi dengan adanya satu untai utuh DNA target amplifikasi, dan kontaminan tidak mampu untuk menghambat aktivitas enzim polimerase.

Faktor penentu proses isolasi dan purifikasi DNA menurut Syafaruddin dan Santoso (2011) diantaranya adalah: penghomogenan jaringan, komposisi dalam penambahan larutan buffer serta penghilangan enzim-enzim penghambat. Konsentrasi DNA yang rendah dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yakni; disosiasi jaringan dan presipitasi DNA dari jaringan sel yang kurang maksimal sehingga menyebabkan ekstraksi DNA dari dalam sel hanya sedikit. Selain itu juga dapat disebabkan oleh pengikatan DNA yang kurang maksimal saat tahap *binding* DNA.

Produk PCR yang teramplifikasi selanjutnya diuji kualitas dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1% dan *marker* 10.000 bp DNA *Ladder* bertegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi produk PCR dilakukan

dengan sinar UV (Ultraviolet) (**Gambar 5.1**). Elektroforesis adalah teknik memigrasikan partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik dalam kondisi yang konstan. Elektroforesis DNA akan memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran dan struktur fisik molekulnya. Fragmen DNA hasil elektroferesis dapat divisualisasikan dengan beberapa cara, yaitu dengan penambahan etidium bromida ke dalam gel sewaktu pembuatannya atau dengan cara gel direndam di dalam larutan etidium bromida sebelum divisualisasikan di bawah UV transiluminator. Etidium bromida merupakan pewarna mutagenik yang akan berikatan dengan bagian basa dari DNA dan menyebabkan transmisi sinar UV menjadi dapat dilihat (Ocvania, 2015).



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)

Keterangan : M : Marker 1 kb, 12D : B04001RT, 13D : B03003RT, 14D : B05006RB , dan 15D : B05005RB. Keempat sampel hasil isolasi menggunakan kit Qiagen menunjukkan pita lebih dari 10.000 bp



Hasil gel elektroforesis menunjukkan fragmen DNA memiliki kualitas yang baik. Hal ini ditandai dengan pita yang tebal dan utuh. Pita DNA yang tebal menunjukkan konsentrasi DNA total yang diperoleh cukup tinggi (Ocvania, 2015). Hasil menunjukkan adanya *band* di atas marker 10.000 bp sehingga DNA yang terisolasi memiliki ukuran lebih dari 10.000 bp. DNA mitokondria total (genome mitochondrion) *Cervus timorensis* yang ada pada Genbank memiliki ukuran 16.434 bp sehingga hasil elektroforesis pada **Gambar 5.1** berada di atas marker yaitu di atas 10.000 bp. Hasil isolasi DNA total dilakukan uji kualitas dengan elektroforesis menggunakan konsentrasi agarose 1%.

## 5.2 Amplifikasi Gen Cox-2 dengan Metode PCR

Amplifikasi gen Cox-2 dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen Cox-2 yang banyak sehingga dapat digunakan untuk melihat similaritas antara sekuen DNA Rusa Timor dan Rusa Bawean pada Taman Safari 2 Prigen. Tahap ini bertujuan untuk mengetahui urutan nukleotida Rusa Timor berdasarkan sekuen gen Cox-2. Program PCR tersebut menggunakan sepasang primer berdasarkan desain primer yang didapatkan dari *Genebank* NCBI dengan *Reference Sequence*: KY117575.1 menggunakan *Primer3plus*, sehingga didapatkan sepasang primer *forward* dan *reverse* yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Program PCR yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tahap pradenaturasi, denaturasi, *annealing*, ekstensi dan post-ekstensi dengan waktu dan suhu yang dipaparkan pada **Tabel 5.3**. Selain sepasang primer didapatkan pula origin oligo nukleotida gen Cox-2 *Cervus timorensis* dari NCBI (**Gambar 5.2**).

**Tabel 5.2 Urutan Oligo Nukleotida Primer gen Cox-2 Rusa Timor**

Primer	Origin Nukleotida
<i>Forward (Cox-2_F)</i>	'GCACAATAGACGCTCAAGAG'
<i>Reverse (Cox-2_R)</i>	'GAAGCT GTGATTTGATCCGC'

```

7021 tacaactagg ttttcaagat gcaacatcac ccattataga agaactacta cattttcatg
7081 atcatacatt aataattggt ttttcaatca gctcactagt actctatgtc atttcattaa
7141 tgctaacgac aaaattaaca cacactagca caatagacgc tcaagaggta gagacgatct
7201 gaacaatcct accggctatt atcctaattt taattgctct cccatctttg cgaattttat
7261 atatgataga cgaaattaac aatccatctc ttacagtaaa aactatagga catcaatgat
7321 actgaagcta cgagtatacg gattatgaag acttaagctt cgactcctat ataattccaa
7381 catcagaact aaaaccagga gaactacgac tactagaggt agataatcga gttgtcctac
7441 caatagaaat aacaatccga atgttagtct cctctgaaga cgtactgcac tcttgagccg
7501 taccctctct aggactaaaa acggacgcaa tcccaggccg cctgaaccac acaactctta
7561 tatcgactcg accagggcta tattacggac aatgctctga aatctgcgga tcaaatcaca
7621 gcttcatacc tattgttctt gaactagttc cattaataa cttcgaaaaa tgatctgcat
7681 caatactata aaatcattaa gaagctaaaa tagcgctagc cttttaagct agagatcgag
7741 agtacaatgc tctccttaat gaaatgccac aactggatac atccgcatga cttataataa

```

**Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen Cox-2**

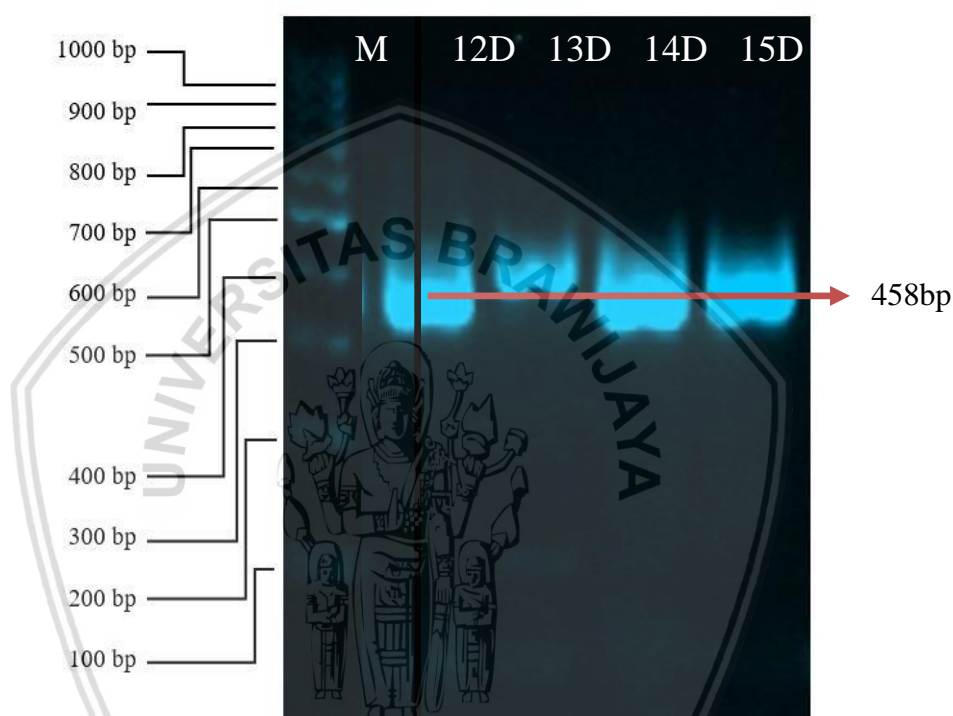
Keterangan : Kuning: Primer *forward* Cox-2, Biru: Primer *reverse* Cox-2, Abu-abu : *Region of interest*

(National Center for Biotechnology Information, 2018).

**Tabel 5.3 Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen Cox-2**

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4menit	94°C
Denaturasi	30detik	94°C
Annealing	30detik	52,8°C
Extensi	1menit	72°C
Post Extensi	7menit	72°C

Produk PCR di uji secara kualitatif dan didapatkan adanya pita DNA dengan ukuran 458 bp sesuai dengan target amplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang telah di desain. Hasil elektroforesis produk PCR konsentrasi agarose 1,7% dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 1,7%

Keterangan : Keterangan : M : Marker 1 kb, 12D : B04001RT, 13D : B03003RT, 14D : B05006RB , dan 15D : B05005RB. Empat sampel produk PCR menunjukkan adanya pita marker 458 bp (Lampiran 4).

Pada **Gambar 5.3** terlihat adanya visualisasi pita dengan ukuran fragmen 458 bp pada hasil elektroforesis purifikasi produk PCR, Empat pita tersebut sesuai dengan target gen Cox-2 yang diinginkan. Pada sampel 13D terlihat pola pita yang berbeda, menurut Agustian (2008) menyatakan perbedaan pola pita

dapat ditunjukkan dalam perbedaan jumlah pita yang dihasilkan. Perbedaan pola pita dapat menggambarkan perbedaan genetik sampel. Hal ini membuktikan bahwa gen Cox-2 telah berhasil di amplifikasi secara spesifik dan hasil purifikasi produk PCR siap di sekuensing.

### 5.3 Sekuen Gen Cox-2

Penelitian ini menggunakan Sampel yang dipilih untuk sekuensing adalah sampel Rusa Timor. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi Sanger menggunakan Automatic *DNA sequencer* yang berdasarkan pada metode *dye terminator labelling*. Hasil sekuensing dibaca menggunakan software Bioedit 7.2.5. Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing) dan data berupa *fasta* (urutan basa-basa hasil sekuensing). Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen basa nukleotida yang memiliki kesamaan basa nukleotida terhadap *database* NCBI (daerah *conserved*). Menurut Jegga and Aronow (2006), daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen basa nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutasi pada segmen DNA yang disejajarkan.

Hasil sekuensing DNA berupa grafik elektroferogram (grafik yang menunjukkan basa-basa yang terekam pada hasil sekuensing) dan data dalam format *fasta* (urutan basa-basa hasil sekuensing) (**Lampiran 7**). Masing-masing hasil sekuensing sampel dimasukkan ke program BLAST NCBI untuk mengetahui kesejajaran basa nitrogen hasil sekuensing dengan *database* NCBI (**Lampiran 5**).

**Tabel 5.4. Query coverage dan ident sampel**

Sampel	Query coverage	Ident
B04001RT	100%	95%
B03003RT	100%	95%
B05006RB	100%	96%
B05005RB	100%	97%

Pada **Tabel 5.4**, sampel Rusa Timorensis B04001RT memiliki *query coverage* 100% dan ident 96% terhadap NCBI Genebank : KY117575.1 *Cervus timorensis*, sampel Rusa Timorensis B03003RT memiliki *query coverage* 100% dan *ident* 95%, sampel Rusa Bawean B05006RB memiliki *query coverage* 100% dan *ident* 96%, dan sampel Rusa Bawean B05005RB memiliki *query coverage* 100% dan *ident* 97% terhadap NCBI Genebank : MF435989.1 *Axis porcinus*. Keempat sampel memiliki nilai di atas 95% sehingga kualitas sekuen dinyatakan baik sesuai dengan pernyataan Wiley (2011) bahwa sekuens DNA yang memiliki nilai ident dan *query cover* pada kisaran 95%, maka kualitas yang dimiliki adalah baik untuk dilakukan analisa.

Urutan hasil sekuen pada sampel Rusa Timorensis B04001RT menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 123 sampai 423 dari database NCBI, sampel Rusa Timorensis B03003RT menunjukkan adanya kesejajaran dari basa ke 124 sampai 422 dari database NCBI, sampel Rusa Bawean B05006RB menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 125 sampai 421 dari database

NCBI, sedangkan sampel Rusa Bawean B05005RB menunjukkan adanya kesejajaran pada basa ke 121 sampai 423 dari database NCBI (Lampiran 5).

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA Gen Cox-2

Berdasarkan *Alignment* sekuen DNA terhadap tiga referensi yang sama yaitu gen Cox-2 *Cervus timorensis* Database NCBI Locus KY117575.1 dan *Axis porcinus* MF435989.1. Urutan sekuen sampel yang dapat disejajarkan dimulai dari basa 124 sampai 422 dengan total target gen yaitu 298 bp (**Gambar 5.8 dan Lampiran 6**). Menurut Hsieh *et al* (2001), panjang fragment gen di atas 200bp tersebut cukup untuk membedakan antara dua spesies yang sangat dekat.

**Tabel 5.5** Perubahan basa terhadap Referensi

Mutasi	<i>Cervus timorensis</i>	<i>Axis porcinus</i>
<i>Cervus timorensis</i>	-	31 basa
<i>Axis porcinus</i>	31 basa	-
B04001RT	7 basa	37 basa
B03003RT	2 basa	30 basa
B05006RB	33 basa	23 basa
B05005RB	33 basa	7 basa

Berdasarkan (**Tabel 5.5**), Referensi gen Cox-2 *Cervus timorensis* memiliki 33 basa nukleotida yang berbeda dengan referensi Cox-2 *Axis porcinus*. Sampel pertama B04001RT yaitu Rusa Timor memiliki 28 basa nukleotida dengan referensi *Cervus timorensis* dan memiliki 58 basa nukleotida dengan



refrensi *Axis porcinus*. Sampel kedua B03003RT yaitu Rusa Timor memiliki 22 basa nukleotida dengan refrensi *Cervus timorensis* dan memiliki 58 basa nukleotida dengan refrensi *Axis porcinus*. Sampel ketiga B05006RB yaitu Rusa Bawean memiliki 45 basa nukleotida dengan refrensi *Cervus timorensis* dan memiliki 10 basa nukleotida dengan refrensi *Axis porcinus*, dan Sampel keempat B05005RB yaitu Rusa Bawean memiliki 42 basa nukleotida dengan refrensi *Cervus timorensis* dan memiliki 8 basa nukleotida dengan refrensi *Axis porcinus*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Rusa Bawean lebih dekat dengan *Axis porcinus*, perbedaan basa nukleotida dapat juga diketahui melalui pembuatan pohon filogenetik dari sekuen gen Cox-2.

**Tabel 5.6 Jenis Mutasi pada Sampel**

Sampel	Jenis mutasi	Daerah mutasi	Jumlah	Total
B04001RT	Transversi	Basa ke 10,11,89,91,107,112	6	10
	Transisi	Basa ke 43	1	
	Inseri-Delesi	Basa ke 239,254,255	3	
B03003RT	Transversi	Basa ke 10,11	2	5
	Transisi	Basa ke -	-	
	Inseri-Delesi	Basa ke 239,254,255	3	
B05006RB	Transversi	Basa ke 1,8,28,32,33,40,43,67,68,295	10	29
	Transisi	Basa ke 5, 7, 9 ,31, 69, 70, 114, 223, 249, 292, 293,294,296	13	
	Inseri-Delesi	Basa ke 14,28, 68,235,251,252	6	
B05005RB	Transversi	Basa ke 297,298,299,3011	4	7
	Transisi	Basa ke 252, 225, 300	3	
	Inseri-Delesi	-		



**Tabel 5.6** menunjukkan jenis mutasi terhadap referensi NCBI Locus D828891 *Cervus timorensis*. Perubahan atau mutasi genetik sampel terhadap referensi ada dua jenis, yaitu transversi dan transisi. Transversi adalah suatu pergantian antara purin dengan pirimidin pada posisi yang sama. Transisi adalah suatu pergantian basa purin dengan basa purin lain atau pergantian basa pirimidin dengan basa pirimidin lain atau disebut juga pergantian suatu pasangan basa purin-pirimidin dengan pasangan purin-pirimidin lain (Wariant, 2011). Selain itu menurut Lemey (2009), terdapat juga mutasi berupa penambahan basa nukleotida (insersi), dan pengurangan basa nukleotida (delesi). Namun, mutasi yang mempengaruhi pada gen Cox-2 hanya berupa substitusi silent yaitu transversi dan transisi sesuai dengan pernyataan Rahman (2010) bahwa perbedaan urutan basa nukleotida (transversi dan transisi) tidak diikuti dengan perubahan asam amino. Pada hasil sekuensing menunjukkan adanya perubahan basa menjadi M (keto), Y(purine), K(amino), S(strong), R(pyrimidine), W(weak) yang biasa disebut dengan notasi DNA. Menurut Zimmerman (1991), notasi DNA dapat disalin atau diartikan pada basa purin pirimidine sesuai dengan symbol IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) yang dibaca menurut grafik elektroforegram dan tabel lengkap pada masing-masing sampel dijelaskan pada **Lampiran 10**.

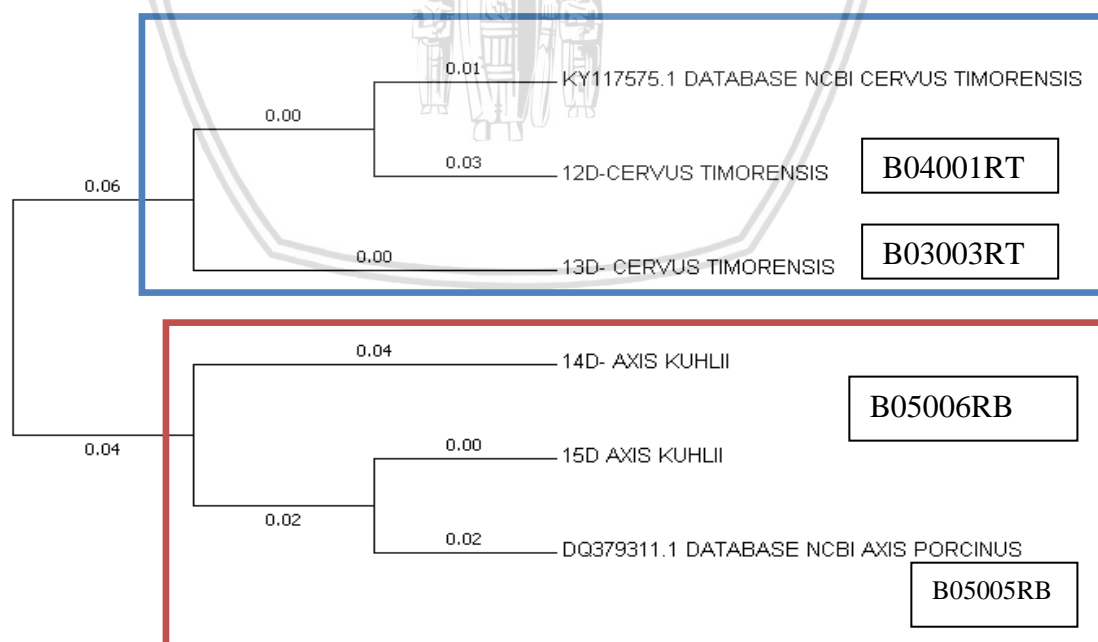
Berdasarkan jenis mutasi yang mempengaruhi gen Cox-2 pada rusa timor sesuai dengan **Tabel 5.6** sampel B04001RT mengalami 7 perubahan basa nukleotida, sampel B03003RT mengalami 2 perubahan basa nukleotida dengan perbandingan referensi Database NCBI Locus KY117575.1 dan pada referensi

Database NCBI Locus MF435989.1 maka sampel B04001RT mengalami 37 perubahan basa nukleotida, sampel B03003RT mengalami 30 perubahan basa nukleotida. Dan, berdasarkan jenis mutasi yang mempengaruhi gen Cox-2 pada rusa bawean sesuai dengan Tabel 5.6 sampel B05006RB mengalami 33 perubahan basa nukleotida, sampel B05005RB 33 perubahan basa nukelotida dengan perbandingan refrensi Database NCBI Locus KY117575.1 dan pada refrensi Database NCBI Locus MF435989.1 sampel B05006RB mengalami 23 perubahan basa nukleotida, sampel B05005RB 7 perubahan basa nukelotida.

### **5.5 Karakteristik Genetik Rusa Timor dan Rusa Bawean Berdasarkan Pohon Filogenetik**

Studi filogenetik merupakan cara yang paling tepat untuk menghubungkan beberapa kelompok organisme dengan membuat atau mendesai pohon filogenetik. Pohon filogenetik digunakan untuk membatasi taksa masing-masing kelompok individu yang saling terhubung (Sukartiningrum, 2012). Analisa filogenetik berkaitan erat dengan peristiwa evolusi biologis, evolusi adalah proses gradual suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks. Keturunan suatu organisme akan memiliki perbedaan dengan nenek moyangnya sebab berubah dalam proses evolusi. Selain mempelajari tentang evolusi, analisa filogenetik dapat digunakan untuk mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi dengan menghitung jarak genetik dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen berdasarkan urutan DNA (Brinkman and Leipe, 2001).

Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan software Mega 7. Perhitungan jarak genetik menggunakan metode pairwise distance yang hasilnya ditunjukkan pada **Lampiran 8**. Metode yang digunakan untuk mendesain pohon filogenetik adalah *Neighbor-Joining* dengan replikasi bootstrap 1000 kali. Penelitian Hsieh (2001) juga merekonstruksi pohon filegoenetik dengan metode *neighbor-joining* dengan bootstrap 1000 kali yang hasilnya sama jika dikomparasikan dengan klasifikasi dengan identifikasi morfologi. Metode *Neighbor-Joining* merupakan metode pembuatan pohon filogenetik berbasis (*distance based*) dimana analisisnya secara cluster dan dengan minimum evolution. Sekarang, metode *Neighbor-Joining* merupakan metode pembuatan berbasis distance based yang paling sering digunakan (Lemey, 2009). Hasil rekonstruksi pohon filogenetik pada sampel ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.



**Gambar 5.4** Pohon filogenetik Rusa Timor dan Rusa Bawean menggunakan metode Neighbor-Joining dengan replikasi bootsrap 1000x. Keterangan : Biru = Rusa Timor & Merah = Rusa Bawean

Bootstrap adalah prosedur statistika yang melakukan sampling dari sebuah populasi yang dikerjakan dengan cara resampling dari sampel. Dalam analisa filogenetik, metode bootstrap diaplikasikan dengan resample data, dengan secara acak memilih kolom vertikal dari sekuen yang dijejerkan untuk menghasilkan penjejeran dan dalam pengaruh sebuah penjejeran baru dengan panjang yang sama. Masing masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom mungkin tidak digunakan pada semua penjejeran yang baru. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan resampled dari kolom dalam multiple sequence alignment untuk membentuk beberapa penjejeran baru (Dharmayanti, 2011).

Sampel Rusa timor B04001RT memiliki jarak genetik 0,04, sampel B03003RT memiliki jarak genetik 0,01, sampel Rusa bawean B05006 RB memiliki jarak genetik 0,15, dan sampel B05005RB memiliki jarak genetik 0,13 dari refrensi data NCBI locus KY117575.1 *Cervus timorensis*. Sampel Rusa timor B04001RT memiliki jarak genetik 0,17, sampel B03003RT memiliki jarak genetik 0,14, sampel Rusa bawean B05006 RB memiliki jarak genetik 0,08, dan sampel B05005RB memiliki jarak genetik 0,04 dari refrensi data NCBI locus MF435989.1 *Axis kuhlii*.

Pohon filogenetik pada **Gambar 5.4** menunjukkan sampel rusa bawean B05006RB dan B05005RB dekat dengan refrensi Database NCBI Locus MF435989.1 yaitu *Axis porcinus* sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh avemmer pada tahun 1983 bahwa bentuk cranium dari *axis kuhlii* dan *axis porcinus* sama. Sampel B05006RB dan B05005RB berbeda dengan refrensi

Database NCBI Locus KY117575.1 sehingga pada tahun 1987 yang awal mulanya *cervus kuhlii* ditetapkan menjadi *axis kuhlii*. Pohon filogenik pada **Gambar 5.4** menggambarkan bahwa *Cervus timorensis* dan *Axis kuhlii* berbeda genus karena berada pada clade yang berbeda. Menurut penelitian Kuznetsova (2004), menganalisa dua clade utama hasil dari penyejajaran subfamili *cervinae* menggambarkan genus yang berbeda.



## DAFTAR PUSTAKA

- Agustian, A. 2008. *Karakterisasi variasi genetik Jatropha curcas L. dengan menggunakan marka molecular Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*. Departemen Biologi. FMIPA UI. Jakarta.
- Brinkman, F. And D. Leipe. 2001. *Phylogenetic Analysis. In : Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Gene and Protein*. Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (Eds). John Willey & Sons.
- Chen, B. Y. and H. W. Janes. 2002. *Methods in Biomolecular Biology*. PCR Cloning Protocol 2nd Ed. Rutgers University.
- Daud Samsudewa And S.S. Capitan. 2011. *Reproductive Behaviour Of Timor Deer (Rusa Timorensis)*. 2university Of The Philippines Los Baños, Los Baños, Laguna, Philippine.
- Dharmayanti, Indi N.L.P. 2011. *Filogenetika Molekuler. Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. Bogor : Balai Besar Veteriner
- Fatchiyah. 2008. Buku Praktis: *Mengenal Polymerase Chain Reaction Dasar Teknik Amplifikasi DNA & Aplikasinya*. UB. Malang.
- Garsetiasih. R., dan T. Mariana. 2002. *Model Penangkaran Rusa*. Bogor.
- Gatc-biotech. 2017. *Sanger sequencing*. <https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/sanger-sequencing.html>. [22 Desember 2017).
- Handoyo, D dan A. Rudiretna. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas, Vol.9, No 1.
- Hebert PDN, Cywinska NA, Ball SL, de Waard JR .2003. *Biological identifications through DNA barcodes*. Proc Roy Soc B-Biol Sci 270: 313– 321.
- Hsieh, Hsing-Mei., Chiang, Hsiao-Ling., Tsai, Li-Chin., Shu-Ya Lai., Nu-En Huang, Adrian Linacre, and James Chun-I Lee. 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic science international*. 122 (7-18).
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural). 2013. *IUCN Red List of Threatened Species*. <<http://www.iucnredlist.org>>. [24 Maret 2017].



- Jegga, A. G. and B. J. Anorow. 2006. *Evolutionarily Conserved Noncoding DNA*. Encyclopedia of Life Sciences.
- Johannes M. Herrmann, Hans Koll, Robert A. Cooks, Walter Neupert, And Rosemary A. Stuart. 1995. Topogenesis Of Cytochrome Oxidase SubunitII: Mechanisms Of Protein Export From The Mitochondrial Matrix\*. *Institut Für Physiologische Chemie Der Universität München*. Vol. 270, No. 45, Issue Of November 10, Pp. 27079–27086.
- Khan, H.A., IA Arif., AH Bahkali., AH Al Farhan., and A.A Homaidan. 2008. Bayesian. Maximum Parsimony and UPGMA Models for Inferring the Phylogenies of Antelopes Using Mitochondrial Markers. *Evolutionary Bioinformatics* 4:263-270.
- Klug, W. S. and W. R. Cummings. 2003. *Concept of Genetic*. 7th ed. Prentice Hall Pearson Education Inc. Upper Saddle River.
- Kuznetsova M. V., M. V. Kholodova, and A. A. Danilkin. 2004. Molecular Phylogeny of Deer (Cervidae: Artiodactyla). *Russian Journal of Genetics*, Vol. 41, No. 7.
- Lemey, Phillipe., Marco Salemi., and Anne-Mieke Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press., United Kingdom.
- Mahmud, A.T.B.A. 2014. *Evaluasi Kemurnian Genetik Sapi Bali di Kabupaten Barru Menggunakan DNA Penciri Mikrosatelit Lokus Inra035* [Skripsi]. Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Marlina, P.R., A.E. Putra, Rustini, Y. Aldi. 2015. Desain Primer *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (PCR) Gen E6 HPV Tipe 45 dan HPV Tipe 52. *Prosiding Seminar Nasional & Workshop*, 158-165.
- Michel H, J Behr, A Harrenga, A Kannt. 1998. Cytochrome c oxidase: Structure and Spectroscopy. 1998. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:329–56.
- Moritz C, and C Cicero. 2004. *DNA Barcoding: Promise and Pitfalls*. PLoS Biology. 2(10): e354.
- Muladno. 2002. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda-USESE Foundation. Bogor.



- [NCBI] National Center for Biotechnology Information . 2018. *Cervus timorensis Cox-2 Partial CDS*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY117575.1> [28 Juni 2018].
- Nollet LML and F. Toldrá. 2011. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. CRC Press. New York.
- Ocvania, Nur. Roslim, Dewi I., dan Herman. 2015. *Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Total Pada Tanaman Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz) Genotipe Roti dan Menggalo*. Pekanbaru. Repository FMIPA University of Riau.
- Pattiselanno, F. 2002. *Grazing Habitat of the Rusa Deer (Cervus timorensis) in the Upland Kebar Manokwari*. Biodiversitas Volume 10: 134- 138.
- PROMEGA. 2017. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/?activeTab=0>. [20 Februari 2018].
- Rahman, Abdul. 2010. *Keberagaman Struktur Morfologis dan Gen Cytochrome b DNA Mitokondria Kryptoprus di Das Batang Hari Jambi* [Tesis]. Bogor: IPB Press.
- Santella, R. M. 2006. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genom Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 15:185-187.
- Sasmito, Dinda Eling K., Rahadian Kurniawan dan Izzati Muhimmah. 2014. *Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review*. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V 2014.
- Semiadi, G And R.T.P. Nugraha. 2004. *Tropical Deer*. Research Center Of Biology Lipi, Bogor, Indonesia. 282 P.
- Sukartiningrum, S.D. 2012. *Penentuan Pohon Filogenetik Bakteri Xilanolitik Sistem Abdominal Rayap Tanah Berdasarkan 16s rRNA [Skripsi]*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi*. J. Biomedis, Vol 1.
- Suwarminiwati, I G. A. A. 2008. *Keragaman Genetik Abalon (Haliotis asinina) di Lokasi Pantai yang Berbeda di Bali Melalui Analisis DNA Mitokondria*. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar.

- Syafaruddin dan Santoso, J. T. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada Kemiri Sunan (Reutalis trisperma (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17 (1): 11-17.
- Thohari M, Burhanuddin Masyud , Marianna Takanjanji. 2011. *Prospek Penangkaran Rusa Timor (Cervus Timorensis) Sebagai Stok Perburuan*. Seminar Sehari Ipb International Convention Center, 14-04.
- Triwibowo. 2010. *Teori dan Aplikasi PCR*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Warianto, C. 2011. *Mutasi. Handout Kuliah*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Wibowo, D.A. 2009. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Gen Sitokrom B DNA Mitokondria dari Delapan Spesies Burung*. IPB. Bandung
- Widowati, E.W. 2013. *Desain Primer Sitokrom B (Cyt b) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk Deteksi DNA Babi*. Laporan Penelitian Individual Lembaga Penelitian Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga. Yogyakarta.
- Wikimedia Commons. 2007. *Adult male Bawean deer (Axis kuhlii)*. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adult\\_male\\_Bawean\\_deer\\_Axis\\_kuhlii.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adult_male_Bawean_deer_Axis_kuhlii.JPG)>. [24 Maret 2018].
- Wikimedia Commons. 2007. *Cervus timorensis in Sir Seewoosagur Ramgoolam Botanical Garden*. <*Cervus timorensis* in Sir Seewoosagur Ramgoolam Botanical Garden>. [24 Maret 2018].
- Yusuf Z. 2010. Polymeras Chain Reaction. *Saintek Vol 5 No.6*. Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo.
- Zimmerman, P. A.; Spell, M. L.; Rawls, J.; Unnasch, T. R.1991. Transformation of DNA sequence data into geometric symbols. *BioTechniques*. 11 (1): 50–52.